

Schwanniomyces castellii CBS 2863으로부터 α -Amylase 유전자 Cloning

박종천¹ · 배 석 · 전순배*

전남대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹생물학과

*Schwanniomyces castellii*의 제능 DNA로 제조된 유전자 은행으로부터 cloning된 α -amylase 유전자가 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현되었다. Cloning된 삽입 DNA 절편의 크기는 약 5.0 kb이었고, Southern 및 immunoblot 분석 결과 cloning된 α -amylase 유전자가 *Sch. castellii*로부터 유래되었음이 확인되었다. *S. cerevisiae* SHY3 형질전환체에서 *Sch. castellii* α -amylase 유전자 발현은 모균주에 비해 낮았으나, 단백질의 분자량 및 효소의 성질은 *Sch. castellii*에서 분리한 α -amylase의 그것과 차이가 없었다.

KEY WORDS □ *Schwanniomyces*, α -amylase gene, cloning

대부분의 효모가 생산하는 α -amylase는 세포의 효소이다(3). α -Amylase는 전분, glycogen 그리고 dextrin의 α -1,4-glucosidic linkage를 임의로 가수 분해함으로써 glucose, maltose 그리고 branched oligo당 (α -limit dextrin)을 생산한다. 그러므로 α -amylase는 전분의 액화에 필수적인 효소이다. 따라서 효모들로부터 α -amylase 생산을 증진시키기 위해 돌연변이 유발(26)과 원형질체 융합(23, 28) 방법 등이 이용되어 왔다. 최근 유전자 산물의 대량 생산을 위한 유전자 재조합 기술이 응용되고 있다. 이런 목적으로 α -amylase 유전자가 *Bacillus amyloliquefaciens*(16), *Streptomyces limosus*(12), *Sacharomycopsis fiburiger*(31), *Schwanniomyces occidentalis*(27, 22), 보리(18) 그리고 쥐(4) 등으로부터 cloning된 바 있다.

그중에서 특히 *Schwanniomyces* 효모 종들은 전분 분해 효소를 생산할 뿐만 아니라 dextrin과 전분의 발효율이 높다(9). 이들 효모들은 비교적 열에 안정한 α -amylase와 debranching 활성을 가진 glucoamylase를 생산하며, 산업적으로 저당 함유 맥주(low-carbohydrate beers)를 생산하는데 이용할 수 있다(5). 그러나 이들은 알코올 내성에 약한 단점을 가지고 있다. 반면, *Saccharomyces cerevisiae*는 알코올 내성에 강하고 발효능이 뛰어나기 때문에 양조와 알코올 생산 과정에 널리 사용된다. 전분을 가수분해할 수 없는 단점이 있다. 따라서 전통적인 방법으로 전분을 알코올로 전환하기 위해서는 발효 전에 먼저 α -amylase와 glucoamylase를 첨가하여 액화와 당화를 시켜야 하는 다원화된 공정으로 이루어져 있다(25). *S. cerevisiae*에 *Sch. castellii* α -amylase와 glucoamylase 유전자를 도입하여 균종이 개발되면 다원화된 발효 공정을 단순화함으로써 경제적인 이용가치가 증대될 수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 *Sch. castellii* 제능 DNA로부터 α -amylase 유전자를 *S. cerevisiae*에 cloning하고 발현시키고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 플라스미드

전분 분해 유전자 공여 균주는 *Sch. castellii* CBS 2863을, 수용 균주로는 *S. cerevisiae* SHY3를, 형질 전환과 λ -DNA 준비를 위한 세균은 *Escherichia coli* HB101과 *E. coli* C600을 각각 사용했다. 그리고 cloning과 효모에서 발현을 위한 플라스미드로는 *E. coli*와 효모간 왕복 운반체인 pYcDE-1을, subcloning을 위한 플라스미드로는 pBR322를 각각 사용했다.

배지 및 배양조건

*E. coli*는 LB (Luria-Bertani) 배지(1% Bacto tryptone, 1% NaCl, 0.5% yeast extract, pH 7.3)에서 37°C로 배양하였고, 세균을 위한 최소배지는 M9 배지(19)를 사용했으며, 평판 배지로는 LB에 2% Bacto agar를 첨가하여 사용했다. 그리고 항생제 저항성 균주를 선별하기 위한 배지로는 LB에 ampicillin(80 μ g/ml)을 첨가하여 사용했다. 또한 효모 및 효모 형질전환체 배양을 위한 배지로는 YEPD(2% glucose, 2% Bacto peptone, 1% yeast extract)와 필요한 아미노산(25~50 mg/ml)이 함유된 최소배지(0.67% yeast nitrogen base, w/o amino acid, 2% 전분 분해 효소 선별 배지는 3% 전분이 함유된 최소배지(minimal starch medium, MSM)를 이용하였다.

시약 및 제한효소

배지제조에 사용된 시약은 Difco Laboratories에서 구입하였고 DNA 분리와 정제에 필요한 시약 및 agarose, acrylamide, bisacrylamide, formamide, TEMED 그리고 hybridization에 관련된 시약 등은 Sigma Chemical Co. 제품을, 제한효소 및 modification 효소, dNTP, random primer 등은 Promega Biotechnology Co. 제품을, 항체제조에 관련된 시약은 Bio-Rad Laboratories 제품을, 그리고 [α -³²P]dCTP 는 DuPont de Nemours and Co. 제품을 각각 구입하여 사용했다.

유전자 은행 제조 및 전분분해 유전자 선별

효모들(*Schwanniomyces* 및 *Saccharomyces*)로부터 재능 DNA의 정제는 Rodriguez 등(17)의 방법을 약간 수정하여 실시하였고, 기타 DNA에 대한 조작은 Sambrook 등(19)의 방법에 따라 실시하였다. *S. cerevisiae*에 재조합 플라스미드의 형질전환은 Hills 등(7)의 dimethyl sulfoxide(DMSO) 방법과 Gingold 등(6)의 protoplast 융합방법을 수정하여 실시하였다. 그리고 전분분해 유전자의 선별은 효모의 형질전환체(Trp^+)를 3% 전분이 함유된 최소배지(고체배지)에 옮겨 균체 주변에 나타나는 침전층이나 iodine 용액을 처리했을 때, 뚜명한 층이 형성 되는 가를(29) 확인하여 선별하였다.

Southern hybridization

사용된 프로브는 Sambrook 등(19)의 방법을 수정하여 α -³²P dCTP(3,000 Ci)와 Klenow fragment 그리고 random primer를 사용하여 primer extension 방법으로 제조하였다. Hybridization은 Smiley 등(20)의 방법에 따라 실시하였다.

Sch. castellii α -amylase 유전자의 subcloning

Ausubel 등(1)의 방법에 따라 전분분해 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드의 제한효소 지도를 작성하였으며, subcloning은 Sambrook 등(19)의 방법에 따랐다. 즉 α -amylase 유전자가 포함된 5.0 kb 삽입 DNA(*EcoRI* 단편)를 pBR322의 *EcoRI* 제한 효소 부위에 재 cloning시킨 다음 불필요한 부분을 제거하기 위해 *AvaI*으로 선형화시킨 pBR322-AMY를 *Bal* 31으로 두 방향에서 deletion시켰다. 그런 다음 α -amylase 유전자가 포함된 재조합 플라스미드를 효모에 형질전환하여 전분분해능이 있는 형질전환체를 선별하였다.

Sch. castellii 및 형질전환체로부터 분리한 α -amylase의 immunoblot 분석

*Sch. castellii*와 전분분해능이 있는 형질전환체를 0.05 M sodium-acetate 완충용액(pH 5.5)에 0.5% 용해성 전분이 첨가된 최소 배지에서 후기 대수기까지 (72시간) 30°C로 배양한 다음, 10,000×g에서 30분 동안 원심 분리하여 균체를 제거한 상등액을 얻었다. *Sch. castellii*로부터 얻어진 상등액은 Bai 등(2)의 방법에 따라 100배, 형질전환체의 상등액은 1,000배로 각각 농축하여 준비한 후, immunoblot에 사용하였다. 그리고 immunoblot에 사용된 단클론 항체는 *Sch.*

*castellii*로부터 정제한 α -amylase(56 KDa)를 사용하여 Sptiz 등(21)의 방법과 Milstein 등(15)의 방법에 따라 제조하였다. 그리고 immunoblot 분석은 Kim 등(10)의 방법에 따라 수행하였다.

결과 및 고찰

전분 유전자(AMY)의 cloning

Sch. castellii CBS 2863 재능 DNA 유전자 은행(약 20,000개의 *E. coli* 형질전환체)으로부터 *S. cerevisiae* Trp^+ 형질전환체 약 35,000개를 얻었다. 이들로부터 전분 최소배지(고체배지)에서 침전층(29)이 형성되는 5개의 clone이 선별되었다(Fig. 1). 이들로부터 재조합 plasmid를 분리하여 제한효소인 *EcoRI*을 처리하여 전기영동으로 분리해 본 결과 재조합 plasmid 모두가 5.0 kb 크기의 삽입 DNA를 가지고 있음을 확인하였다. 이들을 다시 *S. cerevisiae*에 형질전환시켜 모두 전분 분해능이 있음을 확인하였다. 우리는 이들 재조합 plasmid를 pScAMY라 명명하였다(Fig. 2). 제한효소 지도 작성 및 subcloning 재조합 plasmid인 pScAMY로부터 삽입 DNA 절편 5.0 kb를 분리, pBR 322에 재 cloning하여 삽입 DNA를 증폭시킨 후, 제한효소 지도를 작성한 결과 *HpaI* 1개 부위, *KpnI* 2개 부위, *HindIII* 2개 부위 그리고 *SalI* 1개 부위가 있음을 확인하였다(Fig. 2). 이 결과는 Wang 등(27)이

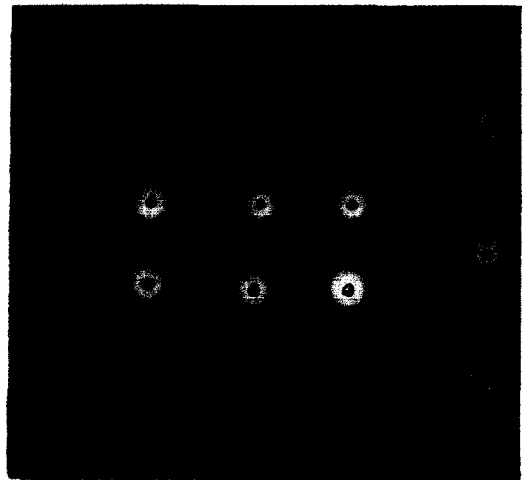


Fig. 1. Secretion of α -amylase from transformants containing recombinant plasmid pScAMY.

Halo zone formed staining with iodine solution (I₂-KI, 0.3~0.6%) shows that the colony secreted α -amylase. Arrows indicate (A) *S. cerevisiae* transformant containing only plasmid pYcDE-1, (B) *S. cerevisiae* transformant containing pScAMY, and (C) *S. cerevisiae* without plasmid.

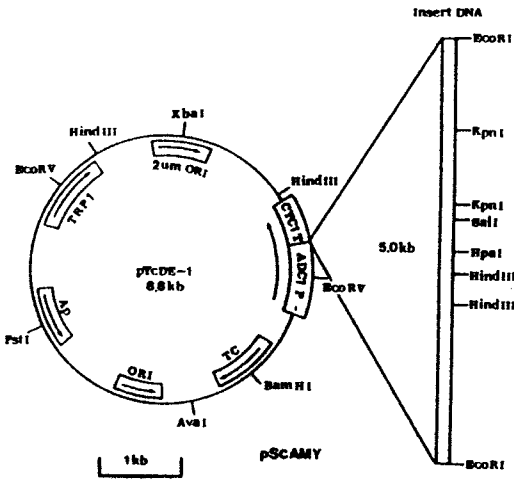


Fig. 2. Restriction map of pYcDE-1 and inserted α -amylase gene.

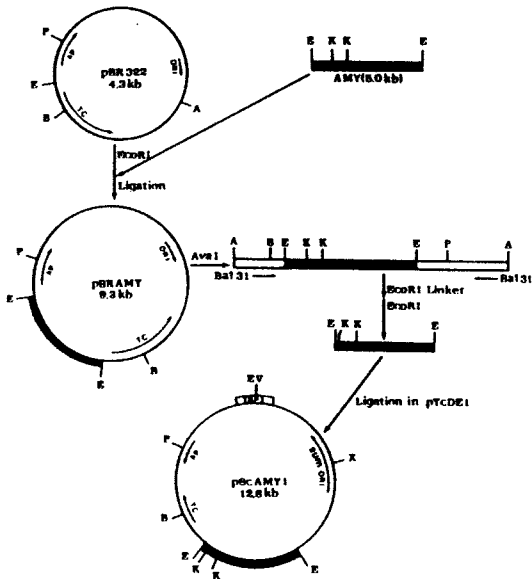


Fig. 3. A scheme illustrating the development of the pScAMY1. The restriction sites for *Ava*I(A), *Bam*HI(B), *Eco*RI(E), *Eco*RV(EV), *Kpn*I(K), *Pst*I(P) and *Xba*I(X) are shown.

Sch. occidentalis CCRC 21164로부터 클oning한 α -amylase 유전자 5.0 kb와 비교했을 때 coding 부위에 *Hind*III 제한효소 부위 1개가 존재한다고 하였으나, 본 연구 결과는 2개 부위가 존재하였다. 필요없는 부분을 제거하기 위해 제한효소 지도에 따라 *Eco*RI-*Hind*III, *Eco*RI-*Hpa*I, *Eco*RI-*Sal*I 그리고 *Kpn*I-

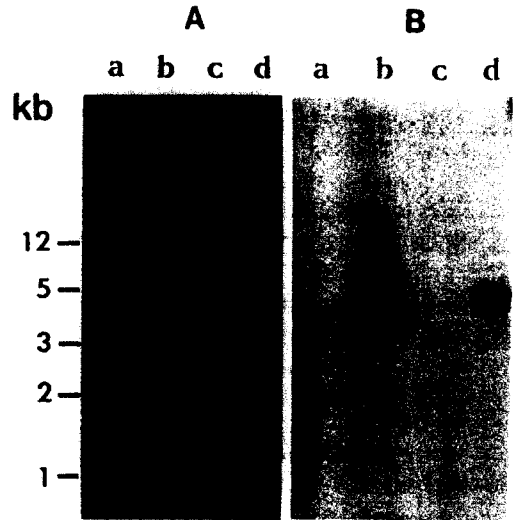


Fig. 4. Southern blot analysis of restriction fragments of pScAMY plasmid DNA and autoradiography. *Eco*RI-digested fragments of genomic DNA from *S. cerevisiae* (lane c) and *Sch. castellii* (lane d) were separated on 0.8% agarose gel (panel A) and hybridized to 32 P-labelled 5.0 kb insert DNA of pScAMY (lane b of panel B). The size of molecular markers (lane a) is shown in kb on the left margin.

*Eco*RI 등의 각 절편을 blunt end화시켜 pYcDE-1에 subcloning하여 전분분해능을 확인하였으나 전분분해능을 가진 재조합 플라스미드를 얻지 못하였다. 따라서 open reading frame(ORF)을 포함한 α -amylase 유전자가 중앙 부분에 위치할 것으로 생각되어 5.0 kb 절편을 pBR322의 *Eco*RI 부위에 삽입한 (pBRAMY) 다음, *Ava*I으로 처리, 선형 plasmid를 만든 후, *Bal*31으로 양쪽 방향에서 결실시켜 AMY 유전자가 포함된 3.8 kb *Eco*RI-*Eco*RI 절편을 얻었다. 이 절편을 pYcDE-1에 cloning 한 재조합 plasmid를 pScAMY1이라 명명하였다(Fig. 3). 지금까지 보고된 *Schwanniomyces* 균종들의 α -amylase 분자량은 39~62 KD이라고 보고되고 있다(9). 따라서 α -amylase 유전자의 coding 부위는 최소한 2.0 kb 내외가 될 것으로 예상되었다. 따라서 3.8 kb DNA 절편에는 ORF 뿐만 아니라 5' 및 3' 인접부위 모두를 포함하고 있을 것으로 사료되었다.

Southern hybridization 및 immunoblot

pScAMY에 삽입된 *Eco*RI 절편인 5.0 kb를 프로브로 사용하여 *Eco*RI으로 완전히 절단한 *Sch. castellii*와 수용균주인 *S. cerevisiae*의 제놈 DNA 절편과 Southern hybridization한 결과 5.0 kb와 동일한 위치에서 *Sch. castellii* 제놈 DNA와 hybridization된 밴드가 나타난 반면, *S. cerevisiae*에서는 전혀 나타나

Table 1. The properties of α -amylase produced by the *S. cerevisiae* transformant (pScAMY1).

Strains	Optimal conditions ^a		Thermostability ^b	Molecular weight
	pH	Tem(°C)	(°C)	(KD)
<i>S. cerevisiae</i> transformant	5.5	40	50	56.0
<i>Sch. castellii</i>	5.5	40	50	56.0

The enzyme activity was measured by Somogy-Nelson method. One unit of enzyme activity is defined by the amount of enzyme which liberates 1 μ M of reducing sugar from soluble starch.

^aThe enzyme activity was measured over the range of 20 to 70°C and over the pH range of 2.0 to 8.0.

^bThe enzyme solution was preincubated for 30 min over the range of 30 to 70°C. A portion of 0.1 ml were taken and assayed for the residual enzyme activity.

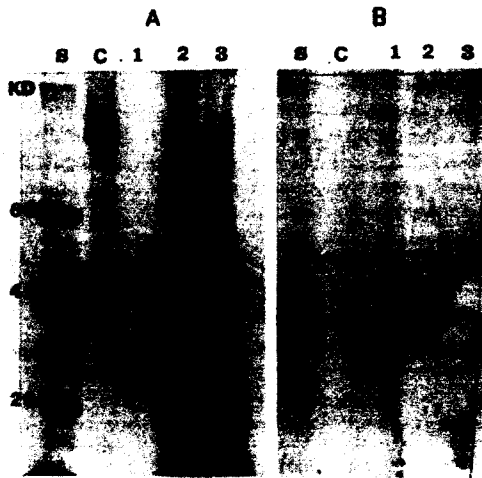


Fig. 5. SDS-PAGE (A) and immunoblotting (B) of α -amylase from *Sch. castellii* and *S. cerevisiae* harbouring pScAMY1.

Crude enzymes obtained from the culture fluid of both microorganisms were separated by SDS-PAGE and probed with a monoclonal antibody against purified α -amylase from *Sch. castellii*. Lane C, culture filtrate from *Sch. castellii* (30 μ g of protein); Lane 1, purified α -amylase (20 μ g of protein); Lane 2, culture filtrate from *S. cerevisiae* transformant (containing pScAMY1); Lane 3, culture filtrate from *S. cerevisiae*; Lane S, standard molecular weight marker protein.

지 않았다(Fig. 4). 이와 같은 결과는 pScAMY에 삽입된 외래 DNA는 *S. cerevisiae*가 아닌 *Sch. castellii*의 제놈 DNA에서 유래되었음을 확인할 수 있었다. 그리고 *S. cerevisiae* 형질전환체(pScAMY1)로부터 분리된 전분 분해 효소를 immunoblot로 확인한 결과(Fig. 5) *S. cerevisiae* 형질전환체(pScAMY1)의 배양상등액에는 *Sch. castellii*의 α -amylase와 동일한 위치에 밴드가 존재하였으나, *S. cerevisiae* 배양상등액

에서는 없었다. 그리고 immunoblot 밴드의 강도 및 크기로 보아 형질전환체나 모균주에서의 α -amylase의 발현 정도는 비슷하였으나, 시료농축 비율을 비교해 보았을 때 형질전환체가 모균주인 *Sch. castellii*에 비해 약 10배 낮았다.

Clone된 유전자의 발현 정도는 대리숙주, promoter 강도, 안정성, 표지유전자 그리고 plasmid의 종류에 따라 달라진다(14). 본 연구에서 AMY 유전자가 clone된 pYcDE-1은 2 μ -based plasmid이고, ADH promoter 그리고 형질전환을 위한 marker로는 Trp 유전자를 가지고 있는데, 이런 종류의 plasmid는 세포당 copy수가 20개 이상으로 보고되고 있다(5). Wang 등(27)은 YEp 16(2 α -based, Leu)에 cloning된 *Sch. occidentalis* CCRC 21164 α -amylase 유전자를 *S. cerevisiae*에 발현시켰는데, 공여 균주인 *Sch. occidentalis* α -amylase 활성보다 약 1.5배 정도 높은 발현을 시킨 바 있다. 그러나 본 연구에서 pYcDE-1 플라스미드를 사용한 *S. cerevisiae*에서 *Sch. castellii* α -amylase의 효소 발현은 공여균주에 비해 낮았다. 따라서 *S. cerevisiae*에서 *Sch. castellii* α -amylase 유전자의 발현을 증진시키기 위해서는 YIp(yeast integrating plasmid)와 같은 벡터를 이용해 cloning된 유전자를 제놈 DNA에 통합(8)하거나, 다중 유전자인 rDNA와 같은 제놈 DNA에 cloning된 유전자를 삽입하는 방법(13) 등을 통해 수행할 수 있을 것이며, 성공할 경우 산업적 활용이 기대된다.

*Sch. castellii*와 *S. cerevisiae* SHY3(pScAMY1)에서 분비되는 α -amylase의 성질 비교

*Sch. castellii*의 α -amylase와 *S. cerevisiae* 형질전환체(pScAMY1)로부터 분리하는 α -amylase의 효소적 성질을 비교하였다(Table 1). Table 1에서 보여주는 것과 같이 이들간 효소에 대한 최적 pH, 최적 온도 그리고 분자량이 일치하였다. 이같은 결과는 Yamashita 등(30)의 *S. diastaticus* glucoamylase 유전자(STA1)로 형질전환된 *Schizosaccharomyces pombe*로부터 분리한 glucoamylase의 분자량이 고도의 당화로 *S. diastaticus*로부터 분리한 그것보다 훨씬 컸다는 결과와는 차이가 있었다.

참 고 문 헌

1. Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl, 1987. Restriction mapping. p. 3.21-3.33. *In* Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons. New York.
2. Bai, S., J.C. Park, D.H. Kim, G.H. Kim, and S.B. Chun, 1991. Purification and properties of glucoamylase from *Schwanniomyces castellii*. *Kor. J. Microbiol.* **29**, 104-110.
3. Calleja, G.B., S.R. Levy-Risk, A. Nasim, and C.V. Lusena, 1987. Extracellular amylase of starch-fermenting yeast: pH Effect on export and residence time in the periplasm. *Crit. Rev. Biotechnol.* **5**, 177-184.
4. Filho, A.S., E.V. Galembeck, J.B. Faria, and A.C. S. Franscino, 1986. Stable yeast transformants that secrete functional α -amylase encoded by cloned mouse pancreatic cDNA. *Bio/Technology* **4**, 311-315.
5. Futcher, A.B., 1988. The 2 μ m circle plasmid of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **4**, 27-40.
6. Gingold, E.B., 1984. Yeast transformation, p. 251-255. *In* J.M. Walker (ed.), Method in molecular biology. Vol. 2. Nucleic Acids. Humana Press. Clifton.
7. Hills, J., K.A. Lon, G. Donald, and D.E. Griffiths, 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5791.
8. Hinnen, A., J.B. Hicks, and G.R. Fink, 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933.
9. Ingledew, W.M., 1987. *Schwanniomyces* a potential super yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* **5**, 159-175.
10. Kim, S.M., S. Bai, H.Y. Chung, J.C. Park, J.J. Lee, D.H. Kim, M.S. Song, and S.B. Chun, 1992. Purification and properties of glucoamylase from yeast *Candida tsukubaensis*. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 519-523.
11. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
12. Long, C.M., M.J. Virolle, S.Y. Chang, S. Chang, and M.J. Bibb, 1987. α -Amylase gene of *Streptomyces limosus*: Nucleotide sequence, expression motifs, and amino acid sequence homology to mammalian and invertebrate α -amylases. *J. Bacteriol.* **169**, 5745-5754.
13. Lopes, T.S., J. Klootwijk, A.E. Veenstra, P.C. van der Aar, H. van Heerikhuizen, H.A. Raue, and R.J. Planta, 1989. High-copy-number intergration into the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*: A new vector for high-level expression *Gene*. **79**, 199-206.
14. Michael, A.R., C.A. Scorer, and J.J. Clare, 1992. Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast* **8**, 423-488.
15. Milstein, C. and G. Kohler, 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predetermined specificity. *Nature* **256**, 495.
16. Palva, I., 1982. Molecular cloning of α -amylase from *Bacillus amyloliquifaciens* and its expression in *B. subtilis*. *Gene* **19**, 81-87.
17. Rodriguez, R.L. and R.C. Tait, 1983. Isolation of high molecular weight DNA from yeast, p. 167-169. *In* Recombinant DNA techniques: An introduction. Addison-Wesley Publishing Co., London.
18. Rogers, J.C. and C. Miliman, 1983. Isolation and sequence analysis of a barley α -amylase cDNA clone. *J. Biol. Chem.* **258**, 8169-8174.
19. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
20. Smiley, G.S.T., C.F. Brunk, and R.E. Perlman, 1983. Hybridization of nucleic acids directly in agarose gels. *Anal. Biochem.* **131**, 365-372.
21. Spitz, M., L. Spita, R. Thrope, and E. Eugul, 1984. Intrasplenic primary immunization for the production of monoclonal antibodies. *J. Immunol. Methods* **70**, 39.
22. Strasser, A.W.M., R. Selk, R.J. Dohmen, T. Niermann, M. Bielefeld, P. Seeboth, G. Tu, and C.P. Hollenberg, 1989. Analysis of the α -amylase gene of *Schwanniomyces occidentalis* and the secretion of its gene product in transformants of different yeast genera. *Eur. Biochem.* **184**, 699-706.
23. Tamaki, H., 1986. Genetic analysis intergeneric hybrids obtained by protoplast fusion in yeasts. *Curr. Genet.* **10**, 431-494.
24. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350.
25. Tubb, R.S., 1986. Amyolytic yeasts for commercial applications. *Trends in Biotechnol.* **4**, 98-104.
26. van Uden, N., C. Cabeca-Silica, M. Madeira-Lopez, and I. Spencer-Martins, 1980. Selection isolation of depressed mutants of an α -amylase yeast by the use of 2-deoxyglucose. *Biotechnol. Bioeng.* **12**, 651-654.
27. Wang, T.T., L.L. Long, and H.H. Wen, 1989. Cloning and expression of a *Schwanniomyces occidentalis* α -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 3167-3172.
28. Wilson, J.J. and W.M. Ingledew, 1982. Isolation and characterization of *Schwanniomyces alluvius* amyolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 301-307.
29. Yamashita, I. and S. Fukui, 1983. Molecular cloning of a glucoamylase preceding gene in the yeast *Saccharomyces*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2689-2692.
30. Yamashita, I., M. Nakamura, and S. Fukui, 1985.

Diversity of molecular structures in the yeast extracellular glucoamylase. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 31, 399-401.

α -amylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* 49, 3089-3091.

31. Yamashita, I., T. Itoh, and S. Fukui, 1985. Cloning and expression of the *Saccharomycopsis fiburigera*

(Received December 10, 1993)

(Accepted December 29, 1993)

ABSTRACT: Molecular Cloning of α -Amylase Gene from *Schwanniomyces castellii* CBS 2863

Park, Jong-Chun¹, Suk Bai, and Soon Bai Chun* (Department of Microbiology, Department of Biology¹, College of Natural Sciences, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea)

The gene encoding α -amylase of *Schwanniomyces castellii* was cloned in *Saccharomyces cerevisiae*. The 5.0-kilobase insert was shown to direct the synthesis of α -amylase. Southern blot analysis confirmed that this α -amylase gene was derived from the genomic DNA of *Sch. castellii*. Immunoblot analysis showed that α -amylase production from *S. cerevisiae* transformant was less than that of donor strain. The α -amylase secreted from *S. cerevisiae* transformant was shown to be indistinguishable from that of *Sch. castellii* on the basis of molecular weight and enzyme properties.